

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 19784

(13) С1

(46) 2016.02.28

(51) МПК

A 61K 31/195 (2006.01)

A 61K 31/315 (2006.01)

A 61P 1/16 (2006.01)

(54)

СРЕДСТВО ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЕ ХОЛЕСТАТИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ

(21) Номер заявки: а 20130070

(22) 2013.01.21

(43) 2014.08.30

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Гродненский государственный ме-
дицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Пашко Анастасия Юрьев-
на; Бушма Михаил Иванович; Бо-
рисенок Ольга Александровна;
Зиматкин Сергей Михайлович; Ми-
хальчук Елена Чеславовна; Барабан
Ольга Викторовна; Шейбак Влади-
мир Михайлович (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение обра-
зования "Гродненский государственный
медицинский университет" (ВУ)

(56) ВУ 11164 С1, 2008.

ВУ 11542 С1, 2009.

КАНУННИКОВА Н.П. и др. Экспери-
ментальная и клиническая фармаколо-
гия. Материалы Международной
научно-практической конференции. -
Гродно, 2011. - С. 171-175.

(57)

Средство для защиты печени при ее холестатическом поражении, содержащее таурин и цинка диаспартат в соотношении 50:1.

Изобретение относится к области медицины, а именно к фармакологии, и может быть использовано для защиты паренхимы печени у больных с холестатическим гепатозо-гепатитом.

Холестатические поражения печени - наиболее частое клиническое проявление патологических процессов, протекающих в печени и характеризующихся уменьшением поступления желчи в двенадцатиперстную кишку вследствие нарушения экскреции и/или выведения на каком-либо участке от гепатоцита до устья Фатерова сосочка [1, 3]. Длительный холестаза приводит к развитию билиарного цирроза печени в течение нескольких месяцев или лет. Изменение паренхимы печени при холестазе обусловлено токсическим влиянием компонентов желчи, а также механическим сдавлением печени расширенными и переполненными желчью желчевыводящими протоками [2, 3].

Известно применение урсодезоксихолевой кислоты в качестве средства для профилактики повреждения печени при ее холестатическом поражении. Последняя защищает поврежденные холангиоциты от токсического воздействия гидрофобных желчных кислот, стимулирует билиарную секрецию и метаболизм желчных кислот, угнетает апоптоз гепатоцитов [4].

Недостатком этого средства является возможность транзиторного повышения активности печеночных трансаминаз, кальцинирования желчных камней; риск развития алопеции, аллергических реакций [5]. Кроме того, она дорогостоящая.

Наиболее близкой к заявляемому изобретению является "Композиция для коррекции нарушений метаболической функции печени, содержащая таурин и сульфат цинка" [6].

Ее недостатком является высокая токсичность сульфата, проявляющаяся раздражением слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (рвота, тяжесть в эпигастральной области и др.).

Задача изобретения - расширение арсенала гепатозащитных средств при холестатическом поражении печени, обладающих низкой токсичностью.

Поставленная задача решается путем создания композиции, содержащей таурин и цинка диаспартат в соотношении 50:1, в качестве средства для защиты печени при ее холестатическом поражении.

Предпосылками для испытаний комбинации таурина с цинка диаспартатом в качестве возможного средства для защиты печени при ее холестатическом поражении послужили данные о полезных свойствах компонентов комбинации. Аминокислота таурин играет важную роль в стабилизации клеточных мембран, модуляции внутриклеточного уровня кальция; обладает цитопротекторными и корригирующими метаболизм свойствами. Проявляет антиоксидантную активность и осуществляет контроль за клеточной дифференциацией и ростом. Играет важную роль в детоксикации цитотоксичных желчных кислот, образуя безопасные таурохолаты.

Цинк входит в состав более 200 ферментов и поэтому является важнейшим внутриклеточным биорегулятором. По-видимому, он, как и таурин, может обладать самостоятельным гепатозащитным действием. Это предположение базируется на том обстоятельстве, что этот микроэлемент входит в состав супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [7], являющихся важнейшими компонентами ферментной системы антиоксидантной защиты клеток.

Органическая соль цинка в отличие от сульфата цинка менее токсична, обладает большей биодоступностью и биоусвояемостью. Аспартат, захватываясь транспортными белками, попадает в клетки вместе с цинком. Кроме того, заявляемое нами изобретение направлено не только на коррекцию нарушенной метаболической функции печени, но и на нормализацию ее структуры. Авторы предлагают гепатопротекторную комбинацию при лекарственном поражении печени. В нашем изобретении - при холестатическом поражении органа, которое встречается гораздо чаще.

Приводим доказательства возможности использования изобретения. Опыты проведены на 25 крысах-самцах с исходной массой 350-400 г. Нарушение функции печени вызывали путем моделирования холестаза. Производилась высокая подпеченочная перевязка общего желчного протока выше места впадения протока поджелудочной железы. Ложнооперированным животным производили те же манипуляции, за исключением перевязки протока. Опытным животным вводили комбинацию таурина и цинка диаспартата в соотношении компонентов 50:1 в желудок в виде взвеси в слизи крахмала, 500 мг/кг, 1 раз в день, 11 дней. Контрольным крысам - слизь крахмала в желудок (контроль на комбинацию таурина и цинка диаспартата).

Голодавших в течение 24 ч крыс декапитировали, брали образцы печени, собирали кровь и получали плазму.

Кусочки печени фиксировали в жидкости Карнуа и заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином [8]. Определяли выраженность морфологических и морфометрических изменений. Кроме того, их окрашивали для выявления содержания рибонуклеопротеидов. Другие кусочки печени замораживали в жидком азоте, готовили срезы в криостате и окрашивали на выявление активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ). Срезы печени также фиксировали в формалине и окрашивали Суданом черным на выявление липидов [9, 10].

Изучение гистологических препаратов, микрофотографирование, морфометрию проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leca DFC 320, Германия), а также программы анализа изображения Image Warp (Bit Flow,

США). В каждой экспериментальной группе оценивали не менее 120-150 структур, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа.

В плазме определяли активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ), а также содержание общего билирубина с использованием рутинных лабораторных методов.

Количественную оценку полученных результатов проводили с использованием непараметрической статистики (критерий Мана-Уитни) [11, 12].

Ниже представлены доказательства холестатического поражения печени.

Результаты морфологических исследований печени свидетельствуют о ее холестатическом поражении, что выражается в увеличении степени деструкции паренхимы печени, вызванной холестазом (табл. 1).

Результаты гистохимических исследований печени. Гепатотоксическое действие холестаза выражается в повышении активности СДГ в гепатоцитах и снижении ЛДГ. Содержание рибонуклеопротеинов при этом существенно не изменяется (табл. 2).

Содержание липидов в гепатоцитах занимает промежуточное положение между значениями в группе ложнооперированных животных и группе крыс с холестазом.

Результаты клинико-биохимических исследований плазмы также свидетельствуют о холестатическом поражении печени. Это подтверждается увеличением в плазме активности АсАТ на 62 % и ЩФ в 2 раза. Содержание общего билирубина возрастает в 46 раз за счет неконъюгированной (увеличение в 39 раз) и конъюгированной фракций (табл. 3).

Доказательства гепатозащитного действия комбинации таурина с цинка диаспартатом в соотношении 50:1 при холестатическом поражении печени.

Результаты морфологических исследований печени. Регистрируется разрастание холангиол, направленное на ликвидацию холестаза. Таким образом, судя по результатам морфологических исследований печени, применение комбинации таурина и цинка диаспартата в соотношении 50:1 является эффективным средством защиты паренхимы печени у крыс при ее холестатическом поражении. Об этом свидетельствует уменьшение площади участков некроза гепатоцитов, значительное снижение фиброзных изменений, повышенное разрастание холангиол (табл. 1).

Таблица 1

Влияние комбинации таурина с цинка диаспартатом на степень деструкции паренхимы печени крыс, вызванной холестазом Me (25 %; 75 %), p

Изучаемые показатели	Ложная операция	Холестаз	Холестаз + таурин с цинка диаспартатом
% Площади, занимаемой соединительной тканью	1,445 (1,063; 1,565)	12,628 (11,028; 19,611) <u>0,002</u> -	6,442 (4,427; 9,666) <u>0,002</u> <u>0,035</u>
% Площади, занимаемой некрозами	0,000 (0,000; 0,000)	0,627 (0,1 16; 3,375) <u>0,044</u> -	0,000 (0,000; 0,000) <u>0,782</u> <u>0,007</u>
Количество желчных канальцев вокруг одной триады	1,500 (1,500; 2,000)	16,250 (14,250; 18,250) <u>0,014</u> -	14,750 (12,250; 18,250) <u>0,014</u> <u>0,372</u>

Примечание. Значения p: над чертой - в сравнении с ложнооперированными, под чертой - с нелеченными крысами с холестазом. Полу жирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) различия.

Результаты гистохимических исследований печени. Нижеприведенные данные свидетельствуют о гепатозащитных свойствах комбинации таурина с цинка диаспартатом в соотношении 50:1 при холестатическом поражении, судя по активности ферментов в гепатоцитах. Повышенная активность СДГ снижается (на 23 %), сниженная активность ЛДГ повышается (таб. 2).

Результаты клинико-биохимических исследований плазмы. В плазме снижается активность маркерных ферментов печени: АсАТ (на 19 %) и ЩФ (на 35 %). Содержание общего билирубина снижается в 14 раз, за счет как конъюгированной (снижение в 14,7 раза), так и неконъюгированной (снижение в 10,8 раз) фракций (табл. 3).

Таблица 2

Влияние комбинации таурина с цинка диаспартатом на активности сукцинат-, лактатдегидрогеназ и содержание рибонуклеопротеинов в гепатоцитах крыс с холестазом Me (25 %; 75 %), p

Изучаемые показатели (ЕД ОП)	Ложная операция	Холестаз	Холестаз + таурин с цинка диаспартатом
СДГ	0,188 (0,186; 0,212)	0,335 (0,325; 0,348) <u>0,013</u> -	0,257 (0,245; 0,282) <u>0,013</u> <u>0,002</u>
ЛДГ	1,084 (1,040; 1,250)	0,647 (0,628; 0,693) <u>0,013</u> -	0,798 (0,764; 0,835) <u>0,013</u> <u>0,001</u>
РНП	0,206 (0,167; 0,231)	0,235 (0,220; 0,258) <u>0,116</u> -	0,211 (0,197; 0,211) <u>0,926</u> <u>0,012</u>

Примечание. ЕД ОП - единицы оптической плотности. СДГ - сукцинатдегидрогеназа. ЛДГ - лактатдегидрогеназа. РНП - рибонуклеопротеины.

Значения p: над чертой - в сравнении с ложнооперированными, под чертой - с нелеченными крысами с холестазом. Полу жирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) различия.

На фиг. 1. показано строение паренхимы печени у крыс с холестазом (выявляются очаговые участки некроза с лизисом гепатоцитов и образованием детрита; разрастания соединительной ткани). Окраска гематоксилином и эозином $\times 40$. Микрофотография.

На фиг. 2 отражены положительные изменения в строении паренхимы печени крыс, получавших комбинацию таурина с цинка диаспартатом в соотношении 50:1, обусловленные значительным снижением фиброзных изменений. Количество соединительной ткани, выявляемое в срезах печени, на 49 % меньше, чем у нелеченных крыс с холестазом. Практически не обнаруживаются участки некроза гепатоцитов. Площадь фиброзных изменений значительно снижена.

Таким образом, результаты исследований, проведенных на крысах с развивающимся холестазом, свидетельствуют о гепатозащитном действии комбинации таурина с цинка диаспартатом в соотношении 50:1. Это подтверждается результатами морфологических и гистохимических исследований печени, а также клинико-биохимических - плазмы. Следовательно, комбинация таурина и цинка диаспартата в соотношении компонентов 50:1 по молекулярной массе (6,25г + 0,348г) может быть использована в качестве средства профилактики и лечения при холестатическом поражении печени.

Влияние комбинации таурина с цинка диаспартатом на активности аспартат- и алатаминотрансфераз, щелочной фосфатазы; содержание билирубина и его фракций в плазме крыс с холестазом Me (25 %; 75 %), p

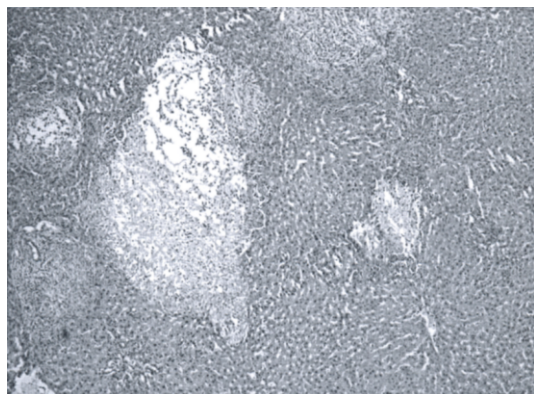
Изучаемые показатели	Условия опыта		
	Ложная операция	Холестаз	Холестаз + таурин с цинка диаспартатом
Холестерол (ммоль/л)	1,6 (1,3; 1,6)	2,6 (2,1; 2,9) <u>0,02</u> -	2,4 (2,2; 2,9) <u>0,04</u> 0,13
Билирубин общий (мкмоль/л)	4,1 (3,8; 4,1)	190,0 (45,2; 207,0) <u>0,02</u> -	26,7 (15,7; 116,9) <u>0,01</u> <u>0,03</u>
Билирубин неконъюгированный (мкмоль/л)	4,1 (3,8; 4,1)	158,6 (103,0; 189,0) <u>0,002</u> -	23,3 (16,5; 60,7) <u>0,03</u> <u>0,005</u>
Билирубин конъюгированный (мкмоль/л)	0	31,5 (14,0; 52,0) <u>0,02</u> -	3,4 (1,5; 24,0) <u>0,01</u> <u>0,01</u>
АлАТ (Ед/л)	62 (57; 62)	64 (34; 108) <u>0,39</u> -	78 (55; 101) <u>0,43</u> 0,84
АсАТ (Ед/л)	132 (128; 150)	214 (109; 297) <u>0,01</u> -	174 (158; 216) <u>0,02</u> <u>0,05</u>
ЩФ (Ед/л)	209 (170; 232)	415 (79; 587) <u>0,02</u> -	269 (151; 513) <u>0,02</u> 0,35

Примечание. Значения p: над чертой - в сравнении с ложнооперированными, под чертой - с крысами с холестазом. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) различия.

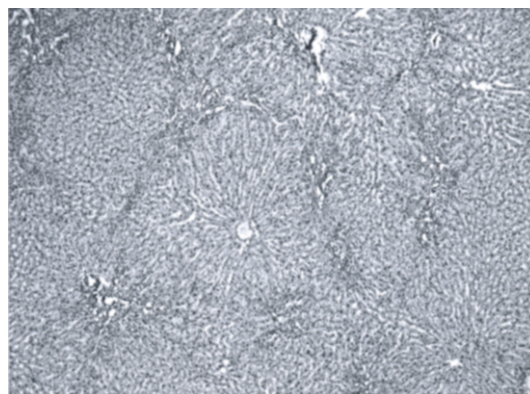
Источники информации:

1. Подымова С.Д. Болезни печени. – М.: Медицина, 1993. - С. 484-485.
2. Desmet V.J. Vanishing bile duct syndrome in drug - induced liver disease // J. Hepatology. Exp. Ther. - 1997. - Vol. 26. - Suppl. 1. - P. 25-31.
3. Минушкин О.Н. Билиарно-печеночная дисфункция. - М.: 2006. - С. 2-12.

4. Konstantinos N.L., Gores G.J., Lindor K.D. Ursodeoxycholic acid "mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders" // J. Hepatology. Exp. Ther. - 2001. - Vol. 35. - P. 134-146.
5. Beuers U. Mechanisms of action of ursodeoxycholic acid. In: Falk Symposium 117. Hepatology - 2000. Kluwer Academic Publishers, 2001. - P. 83-9.
6. Патент BY 11164, 2008.
7. Машковский М.Д. Средства, регулирующие метаболические процессы. Лекарственные средства. В 2 т. - 14-е изд., перераб., исправ. и доп. – М.: Новая волна, 2002. - Т.2. - С. 9-10.
8. Можейко Л.А. Классические методы окраски в гистологии. Методы исследования в гистологии / Под ред. С.М. Зиматкин. - Гродно: ГрГМУ, 2010. - С. 23-34.
9. Меркулов Г.А. Важнейшие методы гистохимического исследования. Курс патологогистологической техники. 5-е изд., исправ. и доп. - Санкт-Петербург: Медицина, 1969. - С. 262-264, 279-280.
10. Зиматкин С.М. Гистохимия ферментов. Методы исследования в гистологии / Под ред. С.М.Зиматкин. - Гродно: ГрГМУ, 2010. - С. 67-78.
11. Реброва О.Ю. Описание количественных данных в зависимости от вида их распределения. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. / О.Ю. Реброва. - М.: МедиаСфера, 2002. - С. 83-91.
12. Реброва О.Ю. Непараметрические методы (критерий Манна-Уитни, Вальда-Вольфовица, Колмогорова-Смирнова). Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. - М.: МедиаСфера, 2002. - С. 109-111.



Фиг. 1



Фиг. 2